UNIVERSITE PAUL-SABATIER

MEDECINE

Toulouse

Avril 1971 - N° 65

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ÉLIMINATION SALIVAIRE DE LA TÉTRACYCLINE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE
présentée
et soutenue publiquement en avril 1971
par

PIERRE MARCHETTI
né le 30 juin 1945, à CASTRES (Tarn)

Membres du Jury

M. J. MONNIER, *président*
Mme L. ENJALBERT
MM. M. CADENAT
P. MONTASTRUC
J. DENARD
assesseurs

1970

Société de l'Imprimerie Artistique
81-Lavaur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536510_0066

UNIVERSITE PAUL-SABATIER

MEDECINE

Toulouse

Avril 1971 - N° 65

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ÉLIMINATION SALIVAIRE DE LA TÉTRACYCLINE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE
présentée
et soutenue publiquement en avril 1971
par

PIERRE MARCHETTI
né le 30 juin 1945, à CASTRES (Tarn)

Membres du Jury

M. J. MONNIER, *président*
Mme L. ENJALBERT
MM. M. CADENAT
P. MONTASTRUC
J. DENARD
assesseurs

1970

Société de l'Imprimerie Artistique
81-Lavaur

UNIVERSITE PAUL-SABATIER

118, route de Narbonne
31 - TOULOUSE

TABLEAU DU PERSONNEL

UNITES MEDICALES

Président de l'Université	M.	LARENG.
Premier Vice-Président	M.	MATHIS
Directeur de l'Unité des Sciences médicales Toulouse-Purpan	M.	MONNIER
Directeur de l'Unité des Sciences médicales Toulouse-Rangueil	M.	ENJALBERT

Doyens honoraires ..... MM. LAZORTHES, GORSE, CALVET, BRUSTIER.

Professeurs honoraires ..... MM. VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER, BUGNARD, VINCENT, MOREL, BOUISSET, CALMETTES, THOMAS, LAGROT, DULUCQ.

Clinique médicale et cardiologique	MM.	DARDENNE
Clinique médicale Sud		GADRAT
Clinique chirurgicale		FICAT
Clin. chirurg. A et Gynécologie ..		POULHES
Clin. chirurg. B et du Cancer		GRIMOUD
Clin. chirurg. infant. et orthopédie.		PASQUIÉ
Clin. chirurg. orthopéd. et traumat.		RIEUNAU
Clin. de Chirurg. cardio-vasculaire..		ENJALBERT
Clin. des mal. cutanées et syphylit.		BAZEX
Clin. des mal. des voies urinaires..		LHEZ
Clinique des maladies infectieuses..		ARMENGAUD M.
Clin. méd. infantile et puériculture.		SOREL
Clin. méd. de la première enfance.		BARDIER
Clinique de neuro-chirurgie		LAZORTHES G.
Clin. neurologique et psychiatrique.		GERAUD
Clinique obstétricale		PONTONNIER
Clinique odonto-stomatologique		CADENAT
Clinique ophtalmologique		N...
Clin. O.R.L. et chir. maxillo-faciale.		CALVET
Clinique de pneumo-phtisiologie ..		DELAUDE
Clinique rhumatologique		RUFFIÉ René
Accouchement et obstétricie sociale.		MONROZIES
Anatomie		BASTIDE
Anatomie pathologique		FABRE Jacques
Anesthésie et Réanimation		LARENG Louis
Bactériologie et Virologie	Mme	ENJALBERT
Biophysique médicale A	MM.	AUVERGNAT
Biophysique médicale B		BRU
Chimie biologique		VALDIGUIÉ Paul
Electro-radiologie		MARQUES
Embryologie générale		BROUSSY Jean
Hématologie		RUFFIÉ Jacques
Histologie		BIMES
Hydrologie, Thérapeut. et Climatol.		N...
Cardiologie clinique et expériment.		N...
Hygiène et médecine sociale		MONNIER
Immunologie		DUCOS
Médecine légale et médec. du trav.		PLANQUES
Pathologie chirurgicale		DAMBRIN
Pathologie gén. et médec. expérim.		SENDRAIL
Pathologie médicale		RIBAUT
Physiologie		LAPORTE Yves
Physiologie appliquée et pharmacol.		BAISSET
Sémiologie et clinique médicale ..		LAPORTE J.
Thérapeutique		DARNAUD

Professeurs à titre personnel

Histologie et Embryologie	MM.	GUILHEM
Anatomie pathologique		BOUISSOU
Biochimie médicale		DOUSTE-BLAZY
Histologie et Embryologie		PLANEL
Oto-Rhino-Laryngologie		CLAUX
Pathologie médicale		BOULARD
Physiologie		MONTASTRUC
Physiologie		BESSOU
Physique médicale		COMMANAY
Pneumo-Phtisiologie		MIGUERES

Professeurs sans chaire

Anatomie pathologique	M.	FABRE Jean
Bactériol., Parasitologie, Virologie.	Mme	LARENG M.-B.

Biochimie médicale	MM.	VALDIGUIÉ P.
Chirurgie générale		GÉDÉON
Chirurgie générale		SARRAZIN
Chir. thoracique et cardio-vasculaire		ESCHAPASSE
Electro-radiologie		PONS
Electro-radiologie		ROULLEAU
Médecine générale et thérapeutique		BOLLINELLI
Ophtalmologie		DEODATI
Pédiatrie		DALOUS
Neuro-chirurgie		ESPAGNO J.
Médecine générale et thérapeutique		SUC
Pédiatrie		RÉGNIER
Médecine générale		RIBET

Maîtres de conférences agrégés

Carcinologie	MM.	ESTRADE
Médecine générale et thérapeutique		BES
Pathologie expérimentale		GLEIZES
Médecine générale		ARLET Jacques
Dermatologie, Vénéréologie		DUPRÉ
Thérapeutique		DENARD
Physiologie		GÉRAL J.-Pierre
Cardiologie		BOUNHOURE
Thérapeut., Réanimat. méd., Rééducation fonctionnelle et Hydrologie		SALVADOR M.
Radiologie		COMBES Pierre
Pneumo-Phtisiologie		ALBARÈDE J.-L.
Pédiatrie génétique médicale		ROCHICCIOLI P.
Chirurgie générale		ESCAT Jean
Chirurgie générale		COSTAGLIOLA
Orthopédie, Traumatologie, Chirurgie plastique et reconstructive ..		UTHEZA Guy
Urologie		PONTONNIER F.
Histologie, Embryol., Cytogénétique		SOLEILHAVOUP
Biophysique		GUIRAUD R.
Physiologie		PAGÉS Bernard
Parasitologie		LARROUY
Immunol., Hématol., Mal. du sang		BIERME Robert
Anatomie et Organogénèse		JUSKIEWENSKI S.
Médecine interne		FÉDOU Robert
Médecine générale		RASCOL

Agrégés

Médecine générale	MM.	CALAZEL
Médecine générale		LE TALLEC
Chirurgie générale		GAUBERT
Médecine légale		GREZES-RUEFF
Neurologie et Psychiatrie		GAYRAL
Ophtalmologie		BEC

Agrégés libres

Chirurgie générale	MM.	SOUQUET
Pathologie chirurgicale		DIEULAFE
Obstétrique		ESPAGNO G.

Maître de conférences associé

Psychiatrie	M.	LABOUCARIÉ

Secrétaire général de l'Université .. M. PRINEAU J.-P.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

A MON PERE

Dont l'affection, la patience, le soutien, m'ont permis de poursuivre mes études et de les mener à bien.

A MA MERE

Que son cœur généreux soit ici récompensé.

A MON FRERE, A MA BELLE-SŒUR

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

Que l'union reste entre nous le bien le plus précieux.

UNIV. LEIDEN BIBL.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. MONNIER

Professeur d'Hygiène et de Médecine sociale,

Médecin des Hôpitaux, Chef de service,

Directeur de l'Unité d'enseignement
et de recherche des Sciences médicales Toulouse-Purpan

C'est un grand honneur que vous nous faites, Monsieur, de bien vouloir présider ce Jury.

Hier vous avez guidé nos premiers pas au lit du malade, aujourd'hui vous nous ouvrez cette belle mais difficile voie qu'est la médecine générale.

Permettez-nous, Monsieur, de vous dire toute notre gratitude et tout notre respectueux dévouement.

A NOTRE JURY DE THESE :

Madame le Professeur L. ENJALBERT

Professeur de Bactériologie et Virologie

En vous demandant de bien vouloir siéger dans ce Jury, nous avons voulu, Madame, vous remercier pour le goût du laboratoire que vous avez su nous communiquer.

Veuillez croire en nos hommages respectueux.

Monsieur le Professeur M. CADENAT

Professeur d'Odonto-Stomatologie,

Directeur de l'Ecole dentaire

Vous avez bien voulu juger cette thèse.

C'est un honneur pour nous, et nous vous en exprimons notre déférente gratitude.

Monsieur le Professeur P. MONTASTRUC

Professeur de Physiologie,

Directeur de l'Institut régional d'Education physique et sportive

La netteté et la clarté de vos cours furent pour nous une source de compréhension dans cette branche si particulière de la médecine.

Nous sommes heureux de vous témoigner notre respectueux attachement et fier de vous compter, Monsieur, parmi nos juges.

Monsieur le Professeur J. DENARD

Maître de Conférence agrégé de Thérapeutique,

Médecin des Hôpitaux

Nous avons eu le privilège de vous compter parmi nos maîtres.

Vous trouverez ici, Monsieur, l'assurance de notre reconnaissance et de notre profond respect.

AUX MEDECINS ET CHIRURGIENS

DU CENTRE HOSPITALIER DE CASTRES

qui nous ont dispensé le fruit de leur grande expérience

au cours de notre stage interné :

Les Docteurs

P. CHABBERT

R. DUFETELLE

E. EDMOND

J.-P. GUIBE

J.-L. LAGARDE

Leur labeur intense et leur dévouement auprès des malades sont pour nous des exemples à suivre.

Qu'ils trouvent ici notre reconnaissance pour les marques de sympathie et d'estime qu'ils nous ont sans cesse prodiguées.

Nous tenons, tout particulièrement, à remercier

Mademoiselle le Docteur D. REURER

attachée au Département médical
des Laboratoires FABRE-INAVA

qui a suivi avec beaucoup d'intérêt l'élaboration de ce travail.

Son aide nous a été très précieuse et nous l'assurons de notre profonde gratitude.

Nous sommes reconnaissants
aux Laboratoires Pierre FABRE
de l'aide qu'ils nous ont apportée
pour l'impression de cette thèse.

Plan

INTRODUCTION.

PREMIÈRE PARTIE : LES METHODES DE DOSAGE DE LA TETRACYCLINE.

MÉTHODES PHYSICO-CHIMIQUES.

Extraction.
Spectro-photométrie dans l'U.V.
Spectro-fluorométrie.

MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES.

Principe.
Méthode turbidimétrique.
Méthode de diffusion.

— diffusion verticale,
— diffusion horizontale.

DEUXIÈME PARTIE : ETUDE DE L'ELIMINATION SALIVAIRE DE LA TETRACYCLINE.

PROTOCOLE.

DISCUSSION DE LA MÉTHODE.

RÉSULTATS.

DISCUSSION.

Analyse des travaux antérieurs.
Commentaires sur nos résultats personnels :

— Elimination salivaire de la tétracycline,
— Intérêt thérapeutique.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

Introduction

Depuis la découverte de Fleming, des centaines d'antibiotiques ont été isolés. Une minorité d'entre eux, choisie pour l'intense activité et la bonne tolérance clinique, a été commercialisée. Aujourd'hui le médecin dispose d'une trentaine de produits nettement individualisés, sans compter les multiples préparations faites d'associations. La richesse de cette pharmacopée se justifie aisément, et en l'occurrence l'abondance ne nuit point. En effet, l'antibiotique idéal, capable de détruire toutes les espèces microbiennes sans revers, n'existe pas. Chaque médication a ses succès et ses limites, et chacune complète plus ou moins les autres.

C'est en coordonnant des données multiples avec minutie, que le choix de l'antibiotique doit se faire. En général, après avoir isolé le germe bactérien, pris connaissance de sa sensibilité aux antibiotiques, précisé les diverses localisations de l'infection dans l'organisme, il faut choisir de préférence l'antibiotique le plus bactéricide, le moins toxique, le moins inactivé par métabolisme, qui produit le moins, et le plus lentement, de résistance microbienne, qui soit d'administration orale et de posologie modérée, et surtout, qui diffuse le mieux et donne la meilleure concentration au niveau du siège de l'infection.

Le laboratoire de bactériologie doit assumer la responsabilité d'orienter le choix, de diriger et de surveiller le traite-

ment. Le bactériologiste, en effet, d'une part identifie le germe causal et en étudie le comportement *in vitro* en face d'une gamme d'antibiotiques, d'autre part, détermine le plus souvent par dosage microbiologique les concentrations de l'antibiotique réalisées dans les humeurs et les tissus de l'organisme.

La stomatologie est probablement la spécialité où la pathologie infectieuse se révèle la plus fréquente et la plus variée quant à l'agent microbien en cause.

Qu'elles soient circonscrites ou diffuses, aiguës ou chroniques, les manifestations infectieuses de la cavité buccale sont le plus souvent installées dans des zones pauvrement vascularisées, et de ce fait, lors d'une antibiothérapie qui paraît suffisante, le foyer infectieux ne sera soumis qu'à une faible dose d'antibiotique.

Nous nous sommes proposés, dans le modeste travail que nous avons entrepris, d'étudier l'élimination salivaire d'une préparation antibiotique à base de Tétracycline* pour savoir si cet antibiotique se trouvait en quantité suffisante, sous forme libre et active dans la cavité buccale pour avoir une action directe sur les foyers infectieux du voisinage, de la même façon que la tétracycline éliminée dans la bile ou les urines est active sur les infections des voies biliaires ou de l'appareil urinaire.

1° Dans une première partie, nous décrivons les méthodes de dosage de la tétracycline à notre disposition :

a) Les méthodes physico-chimiques :
- — spectrophotométrie dans l'ultra-violet,
- — spectrofluorométrie.

b) Les méthodes microbiologiques :
- — dilution en milieu liquide,
- — diffusion verticale en gélose molle,
- — diffusion horizontale sur gélose en boîte de Pétri.

---

* Tétramig, dont la formule est la suivante :

Tétracycline base	0,250 g
Dioctyl sulfosuccinate de sodium	0,100 g
Citrate de sodium	0,200 g
Enrobage, q. s. pour une dragée.	

2° Dans une deuxième partie, nous appliquons cette dernière méthode au dosage de la tétracycline dans la salive, nous donnons :

a) Le protocole de notre expérimentation,
b) La discussion de la méthode,
c) Les résultats et leur commentaire.

Nous terminons par les conclusions que nous avons cru pouvoir tirer de cette étude, et nous complétons par la bibliographie des travaux consultés.

PREMIERE PARTIE

Les méthodes de dosage de la tétracycline

Les dosages en série des antibiotiques dans des échantillons biologiques, revêtent une importance particulière. Si les techniques microbiologiques, qui ont une valeur indéniable quant à l'appréciation de l'activité thérapeutique, devraient être à priori les méthodes de choix, un très grand nombre de méthodes physico-chimiques ont été publiées.

METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

Elles sont toutes tributaires d'une extraction préalable, par exemple : traitement à l'alcool du substrat lyophylisé. En général ces méthodes font appel à des réactions d'halochromie ou d'halofluorie avec des acides concentrés ou divers sels [HCl, H_2SO_4, $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $Th(NO_3)_2$, (ZrO)Cl, etc.]. Leur sensibilité pour les grandes dilutions est insuffisante. D'autres méthodes utilisent les spectres dans l'ultra-violet, la fluorescence ou la microfluorescence pour déceler la présence et évaluer l'antibiotique, lorsque les concentrations deviennent très basses. Nous avons retenu les techniques proposées par G. PITET et Coll. (62).

I. — Méthode d'extraction

L'extraction doit être rapide, facile, totale, sélective. Pour répondre à ces exigences nous avons procédé à l'extraction par le diméthylformamide. L'échantillon biologique (1 ml) (sang, humeur, broyat cellulaire) est immédiatement transvasé après le prélèvement dans un petit flacon de 5 ml de capacité, contenant 3 ml de diméthylformamide. Après agitation et centrifugation, le culot séparé de la phase liquide est remis en suspension dans 1 ml du solvant, l'extraction est renouvelée, on recueille les extraits liquides réunis.

II. — Spectrophotométrie dans l'ultrat-violet

La méthode spectrophotométrique dans l'ultra-violet a des qualités de sensibilité et de fidélité qui sont classiquement reconnues. Les mesures à l'aide d'appareils enregistreurs tels que le Beckman (ou le Lérés) sont faites suivant la technique différentielle par rapport à un échantillon témoin prélevé avant administration de tétracycline. Les courbes d'étalonnage sont construites à partir de quantités égales à 1 ml d'échantillon renfermant 0 - 5 - 10 - 25 - 50 μg d'antibiotique, puis extrait dans les mêmes conditions. Le maximum d'absorption utilisé pour le dosage est de 385 à 390 milli-microns. De grosses erreurs peuvent provenir de la présence d'impuretés d'extraction qui absorbent aux mêmes longueurs d'onde que les tétracyclines, d'autre part le maximum d'absorption spectrale des tétracyclines dans l'ultra-violet est influencé par le pH, or le pH du solvant diminue au cours de l'extraction. Il en résulte un manque de sensibilité et donc un manque de précision.

III. — Spectrofluorométrie

La fluorescence et la microfluorescence ont été utilisées soit pour caractériser, soit pour doser la tétracycline dans les échantillons biologiques, et même dans l'appareil mitochondrial des cellules. Les extraits obtenus par le diméthylformamide sont examinés au spectrofluoromètre Aminco Bowman : activation à 390 millimicrons et mesure de l'intensité de fluorescence à 530 milli-microns. Les courbes d'étalonnage sont construites à

partir de quantités égale à 1 ml d'échantillon renfermant 0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 μg de tétracycline. Ces étalons sont extraits comme précédemment.

Les courbes seront tracées en portant sur un papier logarithmique les logarithmes des intensités de fluorescence relative par rapport au logarithme des concentrations respectives. Exceptées les erreurs dues aux impuretés d'extraction, cette technique s'avère sensible et précise, mais comme toutes les méthodes physico-chimiques, elle ne permet pas de présumer de l'activité antibiotique du produit étudié.

METHODES MICROBIOLOGIQUES

Malgré les services que rend le dosage physico-chimique, on ne saurait se dispenser du dosage microbiologique : ce dernier apparaît comme seul déterminant pour apprécier le pouvoir antimicrobien du produit entier. La microbiologie analytique offre l'avantage d'une haute spécificité permettant d'apprécier l'activité biologique, et d'une remarquable sensibilité, les quantités mises en évidence étant généralement inférieures au μg/ml.

I. — Principe

Le principe du dosage bactériologique est le suivant : On fait agir, sur une culture microbienne choisie pour sa sensibilité, et dans des conditions aussi semblables et reproductibles que possible, d'une part une série de doses judicieusement choisies d'un produit de référence (étalon) et d'autre part les échantillons du produit à titrer. On mesure ensuite la réponse donnée pour chaque dose de l'étalon ou par l'échantillon du produit à titrer ; à l'aide des réponses correspondant à chaque dose de l'étalon, on trace une courbe étalon grâce à laquelle on calcule ensuite. par interpolation, l'activité de l'échantillon.

Les effets recherchés sur le microorganisme éprouvé portent essentiellement sur l'inhibition de la croissanec bactérienne mise en évidence par les techniques de « dilution » ou de « diffusion ». Dans le premier cas, le microorganisme se trouve dans un milieu liquide en contact avec des quantités décrois-

santes de substance à étudier, la réponse est dans l'appréciation photométrique de la turbidité de la croissance partiellement inhibée.

Dans le deuxième cas, il s'agit d'un milieu de culture gélosé solide, la substance à étudier déposée en surface diffuse dans le gel et inhibe la croissance du germe, la réponse est dans la dimension de la zone d'inhibition.

II. — Méthode turbidimétrique ou technique de dilution

De la documentation scientifique, nous avons retenu la technique proposée par Pro Pharmacopoea dans les *Annales pharmaceutiques françaises*, améliorée par Yavordios et Carraz (54, 79).

1° *Préparation de la suspension microbienne*

A partir d'une culture sur gélose I du *Codex*, de Kiebsiella pneumoniæ ATCC 10031, on prépare une suspension du germe en eau distillée stérile de manière à obtenir 60 % de transmission au Lumétron à 550 milli-microns par rapport à l'eau distillée. Le bouillon de culture Penassay-broth est ensemencé à l'aide de cette solution à raison de 0,6 %.

2° *Préparation de la courbe d'étalonnage*

On dissout 50 mg de tétracycline base dans 5 ml de diméthylformamide et on complète à 50 ml par de l'eau distillée stérile, à partir de cette solution on prépare les dilutions contenant 0,10 - 0,50 - 1 - 2 - 3 - ... µg/ml. Le bouillon de culture ensemencé est réparti à raison de 9 ml dans des tubes de 16 ml, on introduit 1 ml de chaque dilution pour obtenir des concentrations définitives de 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - ... µg/ml.

3° *Préparation de l'échantillon*

L'échantillon est dilué comme l'étalon afin d'obtenir des concentrations définitives présumées à 0,1 et 0,2 µg/ml. Chaque tube est fait en trois exemplaires.

4° *Conduite de l'essai*

On prépare quatre tubes supplémentaires :

— Trois tubes « témoin pousse » : 9 ml bouillon + 1 ml bouillon non ensemencé ;

— un tube « témoin bouillon » : tube identique contenant en plus 0,5 ml de formol.

L'ensemble des tubes est placé dans un bain-marie à 37°.

5° *Lecture*

On règle le 100 % du spectrophotomètre sur le témoin bouillon à 530 milli-microns. Lorsque le témoin pousse atteint 38 à 40 % de transmission (après la 4e heure de culture), on bloque la croissance en plongeant les tubes dans la glace fondante et en ajoutant deux gouttes de formol dans chaque tube.

On lit les pourcentages de transmission pour chaque série de trois tubes. En comparant avec l'étalon on obtiendra un pourcentage d'activité par rapport à l'étalon.

Par sa sensibilité et sa précision, la technique de dilution constitue une excellente méthode de référence, mais son exécution longue et minutieuse se prête mal à de nombreux examens en série.

III. — Méthodes de diffusion

La technique de base employée est la technique de diffusion en gélose instaurée par Heatley pour la pénicilline. Les modalités d'application aux divers antibiotiques ont été décrites par Grove et Randall (31) s'inspirant des techniques préconisées par l'U.S. Food and Drug Administration. Elles ont été reprises par Y. Chabbert et Coll. (4, 16) pour le dosage de la tétracycline dans les liquides biologiques.

1° *Méthode de diffusion verticale en gélose molle*

L'inoculum est représenté par une suspension de spores de Bacillus Cereus ATCC 10702. La gamme étalon est diluée dans le liquide biologique des sujets au temps 0, c'est-à-dire avant toute ingestion d'antibiotique, afin d'obtenir des diffusions identiques avec les solutions de la gamme et les échantillons à titrer.

Les échantillons sont séparés et congelés immédiatement après le prélèvement afin d'éviter la dénaturation de l'antibiotique.

L'ensemencement de la gélose se fait à raison de 1 % à pH 6,8, avec un inoculum donnant environ 10^5 spores par cm^3. La répartition se fait dans des tubes de 4×70 mm. A la surface de la gélose on dépose 0,3 ml de liquide à titrer et des solu-

tions de la gamme étalon. Chaque tube est reproduit en quatre exemplaires. On laisse quatre heures à la glacière pour une prédiffusion. Après douze heures d'étuve à 37°, on lit les distances d'inhibition en 1/10 de millimètre sur la platine mobile d'un microscope à faible grossissement. On obtient une relation linéaire entre les distances d'inhibition et le logarithme des concentrations sur toute l'étendue de la gamme.

2° *Technique de diffusion horizontale sur gélose en boîte de Pétri*

• *Préparation de l'inoculum.* — On utilise Bacillus Cereus var. mycoïdes ATCC 9634 comme souche test. A partir d'une culture sur gélose I du Codex, on obtient les spores par chauffage au bain-marie et lavage répétés. Ces spores sont mises en suspension dans l'eau distillée stérile à un titre de 10^5 spores par millilitre.

• *Préparation des boîtes de Pétri.* — On chauffe le milieu gélosé « Bacto Antibiotic Medium 8 » jusqu'à fusion, on laisse refroidir à 45° et on ensemence à raison de 1 % avec la suspension de spores, le volume de l'inoculum doit permettre d'obtenir une croissance dense mais non confluente. Ensuite on coule en couche mince dans les boîtes de Pétri (7 ml par boîte de 10 cm de diamètre).

• *Préparation des dilutions de l'étalon.* — La solution mère à 1 000 µg/ml est obtenue en dissolvant 50 mg de tétracycline base dans 5 ml de diméthylformamide et en complétant à 50 ml avec de l'eau distillée stérile, ou en dissolvant 50 mg de chlorhydrate de tétracycline dans 50 ml d'eau distillée stérile, mais dans ce cas il faut corriger les résultats en tenant compte du titre du produit initial.

La gamme étalon comporte sept concentrations d'antibiotique croissant de deux en deux depuis 0,1 µg/ml jusqu'à 6,25 µg/ml avec 0,8 µg/ml comme point moyen de référence. Le diluant est fonction de l'échantillon à doser, il doit avoir la même viscosité que l'échantillon ainsi qu'un pH voisin.

• *Dosage.* — L'étalonnage est réalisé à chaque série de dosages. Le dépôt des étalons et des produits à doser se fait au moyen de disques de papier buvard de 9 mm de diamètre, immergés

dans le liquide (on peut utiliser également des cylindres de métal, des perles de porcelaine, des godets creusés dans la gélose).

Chaque boîte de Pétri reçoit quatre disques : deux diamétralement opposés inhibés de la concentration de référence, et les deux autres inhibés de chaque concentration de l'étalon ou de l'échantillon. On prépare quatre boîtes pour chaque dilution de l'étalon ou chaque échantillon. On place ces boîtes à l'incubateur à 37° pendant dix-huit heures.

• *Résultats.* — Les lectures des diamètres des zones d'inhibition sont faites à l'aide d'un appareil de projection donnant une précision de 0,2 mm.

Après correction des résultats de chaque boîte en fonction de la moyenne observée pour le point médian et détermination de la moyenne de chaque point, on trace la courbe d'étalonnage sur du papier semi-logarithmique. Il y a une relation linéaire entre les diamètres des zones d'inhibition et le logarithme des concentrations. Le calcul des concentrations des échantillons se fera directement sur le graphique en fonction des diamètres corrigés des zones d'inhibition.

Aisément reproductible et d'exécution facile, cette méthode sensible permet de déceler des traces d'antibiotique inférieures à 0,1 μg/ml, la précision étant de 5 %.

DEUXIEME PARTIE

Étude de l'élimination salivaire de la tétracycline

PROTOCOLE

L'expérimentation a été conduite chez 40 sujets sains, âgés de 20 à 40 ans, des deux sexes.

Elle a pour but d'étudier les concentrations de la salive en tétracycline, après administration par voie orale d'une dose unique de Tétramig, correspondant à deux grammes de tétracycline base.

Cette posologie a été choisie de façon à simplifier la posologie utilisée en clinique, tout en créant une situation voisine de celle obtenue au cours d'un traitement habituel.

Tous les sujets étaient à jeun au moment de l'absorption du médicament et le sont restés jusqu'à la troisième heure après l'absorption.

La salive prélevée est une salive globale de repos.

Les prélèvements de salive ont été pratiqués avant l'absorption des dragées, à titre de témoin, puis à la deuxième heure

(le sujet étant encore à jeun), à la cinquième heure, à la huitième heure et à la vingt-quatrième heure après la prise du médicament.

La salive étudiée est une salive globale prélevée après un bain de bouche à l'eau distillée, la salivation étant favorisée par une mastication fictive. La salive est recueillie dans de petites boîtes de Pétri et est immédiatement congelée à 20 degrés.

Sur chaque échantillon de salive a été pratiqué un dosage microbiologique de tétracycline selon la méthode de diffusion horizontale précédemment décrite.

DISCUSSION DE LA METHODE

La souche test *bacillus cereus* utilisée s'est avérée, dans les conditions de l'expérimentation, très sensible à la tétracycline.

Le milieu gélosé de culture est à pH 5,4, favorable à la pousse du germe et à l'action de la tétracycline.

La gamme étalon est réalisée dans une solution à pH 6 (pH de la salive), sans adjonction de plasma, ni de salive, ni de mucine, c'est-à-dire sans adjonction de protéines pouvant fixer et donc inactiver jusqu'à 30 % de la tétracycline (5-77).

La viscosité de la salive après congélation est de l'ordre de 1.2 et celle de la gamme étalon est légèrement supérieure à 1, la différence n'est pas suffisante pour influencer le dosage.

L'étalonnage est réalisé à chaque série de dosage à l'aide d'une même solution de tétracycline pour toute l'expérimentation.

La méthode de dosage s'est montrée fidèle et précise, les courbes étalons étant d'une série à l'autre pratiquement superposables (voir encart fin d'ouvrage).

La recherche d'un pouvoir antibiotique dans la salive avant toute administration de tétracycline nous assure de la spécificité de la méthode : ainsi nous avons été conduits à éliminer trois sujets dont la salive au temps 0 présentait une légère activité antibiotique qui pouvait être attribuée à une antibiothérapie encore récente, à l'usage de dentifrices ou de sucreries renfermant des antiseptiques (formaldéhyde).

Certains auteurs ont étudié le pouvoir antibactérien propre de la salive normale en dehors de toute antibiothérapie (80, 83) : cette activité antibactérienne attribuée aux enzymes salivaires (amylase, glycuronidase), au lysozyme, et aussi à un facteur lysozyme-like ou bactéricidine bien identifié, n'est pas décelable par notre méthode.

RESULTATS

Les résultats des dosages de la tétracycline dans la salive ainsi pratiqués, sont exposés sur les tableaux I et II.

Au temps 0, nous n'avons jamais observé de zones d'inhibition, mais la méthode ne nous permet pas d'affirmer qu'il n'y a pas d'antibiotique : nous traduisons cette imprécision en notant des taux $< 0{,}10$ μg/ml.

A certains temps de l'élimination, nous avons observé des zones d'inhibition plus petites que les zones d'inhibition obtenues avec la concentration minimale de la gamme étalon soit 0,10 μg/mal. Dans ces cas nous n'avons pas chiffré les taux $< 0{,}10$ μg/ml.

Un premier examen de ces résultats montre la grande variation individuelle de l'élimination de la tétracycline dans la salive, qui se fait toujours à des taux relativement faibles.

Les taux moyens de tétracycline dans la salive sont de :

— 0,21 μg/ml $\pm$ 0,10 à la 2^{e} heure après l'absorption,

— 0,38 μg/ml $\pm$ 0,19 à la 5^{e} heure après l'absorption,

— 0,24 μg/ml $\pm$ 0,14 à la 8^{e} heure après l'absorption,

— à la 24^{e} heure après l'absorption de tétracycline, les taux d'antibiotique dans la salive ne sont pas chiffrables, mais dans tous les cas il persiste encore une légère activité antibactérienne.

Tableau I

Taux salivaires de tétracycline *(en µg/ml)*

chez l'adulte sain, après administration par voie orale d'une dose unique correspondant à 2 grammes de tétracycline base.

X		Temps 0	2 h	5 h	8 h
1	Gal...	< 0,10	0,38	0,70	0,43
2	Des...	< 0,10	0,13	0,14	0,13
3	Rig...	< 0,10	0,10	0,86	0,36
4	Reb...	< 0,10	0,18	0,80	0,50
5	Bon...	< 0,10	0,10	0,10	< 0,10
6	Cal...	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
7	Bla...	< 0,10	< 0,10	0,10	< 0,10
8	Roc...	< 0,10	0,13	0,84	0,19
9	Cro...	< 0,10	< 0,10	0,17	0,28
10	Dau...	< 0,10	0,10	0,60	0,44
11	Reu...	< 0,10	0,18	0,16	0,11
12	Cou...	< 0,10	< 0,10	0,18	0,37
13	Sca...	< 0,10	0,19	0,21	0,10
14	Pag...	< 0,10	0,10	0,98	0,49
15	Cib...	< 0,10	0,11	0,52	0,60
16	Est...	< 0,10	0,12	0,54	0,38
17	Fab...	< 0,10	0,16	0,26	0,21
18	Col...	< 0,10	0,11	0,18	0,12
19	Caz...	< 0,10	0,16	0,13	< 0,10
20	Neg...	< 0,10	0,35	0,37	0,21

Tableau II

Taux salivaires de tétracyline *(en µg/ml)*
chez l'adulte sain, après administration par voie orale
d'une dose unique correspondant à 2 grammes de tétracycline base.

X	Temps 0	2 h	5 h	8 h
21 Gou...	< 0,10	0,33	0,24	0,12
22 Cou...	< 0,10	0,17	0,28	0,10
23 Bar...	< 0,10	1,00	1,40	0,70
24 Pec...	< 0,10	0,14	0,42	0,48
25 Car...	< 0,10	0,24	0,45	0,54
26 Ang...	< 0,10	0,12	0,30	0,14
27 Mar...	< 0,10	0,60	0,75	0,62
28 Mat...	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
29 Tar...	< 0,10	0,31	0,20	0,12
30 Bar...	< 0,10	0,33	0,19	0,10
31 Pal...	< 0,10	0,18	0,27	0,15
32 Cor...	< 0,10	0,35	0,14	0,12
33 Pra...	< 0,10	0,35	0,28	0,16
34 Gom...	< 0,10	0,27	0,19	< 0,10
35 Nor...	< 0,10	0,13	0,43	0,27
36 Vil...	< 0,10	0,22	0,23	0,32
37 Gog...	< 0,10	0,10	0,39	0,13
38 Cav...	< 0,10	< 0,10	0,30	< 0,10
39 Gar...	< 0,10	0,26	0,34	0,10
40 Vai...	< 0,10	0,26	0,37	0,11
Taux moyens	< 0,10	0,21	0,38	0,24
Ecarts types	0	0,10	0,19	0,14

Pour une meilleure lecture des résultats, nous avons tracé sur des graphiques les courbes d'élimination salivaire de tétracycline, la concentration de la tétracycline dans la salive étant exprimée en fonction du temps après l'absorption. Nous les avons groupés d'après les divers types de courbe d'élimination rencontrés :

Groupe I

Courbes dont le sommet se situe à la deuxième heure : Huit sujets présentent une courbe d'élimination de la tétracycline de ce type : 11 - 19 - 21 - 29 - 30 - 32 - 33 - 34.

Les taux moyens d'antibiotique dans la salive sont de :

— 0,28 μg/ml à la 2e heure après l'absorption,

— 0,19 μg/ml à la 5e heure après l'absorption,

— 0,12 μg/ml à la 8e heure après l'absorption.

L'élimination est faible, apparaît tôt, et se fait lentement.

Groupe II

Courbes dont le sommet se situe à la cinquième heure : C'est l'éventualité la plus fréquente, 22 sujets présentent une courbe d'élimination de ce type : 1 - 2 - 3 - 4 - 8 - 10 - 13 - 14 - 16 17 - 18 - 20 - 22 - 23 - 26 - 27 - 31 - 35 - 37 - 38 - 39 - 40.

Les taux moyens de tétracycline dans la salive sont de :

— 0,22 μg/ml à la 2e heure après l'absorption.

— 0,51 μg/ml à la 5e heure après l'absorption,

— 0,27 μg/ml à la 8e heure après l'absorption.

La tétracycline apparaît dans la salive dès la deuxième heure, le maximum est atteint à la cinquième heure, toutefois à la huitième heure le taux est égal aux deux tiers du taux maximum.

La courbe d'élimination moyenne de la tétracycline dans la salive est de ce type.

On peut donc dire que l'élimination de la tétracycline dans la salive est tardive et prolongée.

Groupe III

Courbes dont le sommet se situe à la huitième heure : Six sujets ont une élimination de ce type : 9 - 12 - 15 - 24 - 25 - 36.

Les taux moyens de tétracycline dans la salive sont de :

— 0,15 μg/ml à la 2^{e} heure après l'absorption,

— 0,33 μg/ml à la 5^{e} heure après l'absorption,

— 0,41 μg/ml à la 8^{e} heure après l'absorption.

L'antibiotique apparaît dans la salive dès la deuxième heure, ensuite le taux augmente progressivement, ou en palier à partir de la cinquième heure, jusqu'à la huitième heure, pour atteindre un taux élevé.

Groupe IV

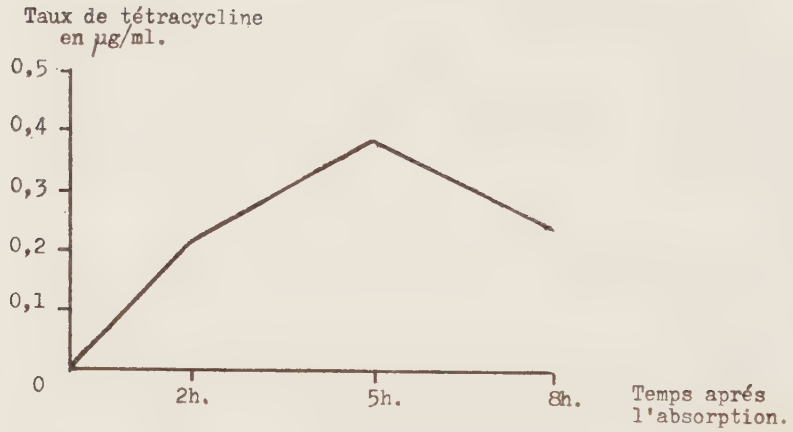
Courbes dont le tracé est plat :

Chez quatre sujets : 5 - 6 - 7 - 28, le taux de tétracycline dans la salive n'a jamais dépassé à aucun temps la valeur de 0,10 μg/ml.

Ici on ne peut pas parler d'une élimination salivaire d'antibiotique.

TAUX MOYENS D'ELIMINATION DE LA TETRACYCLINE

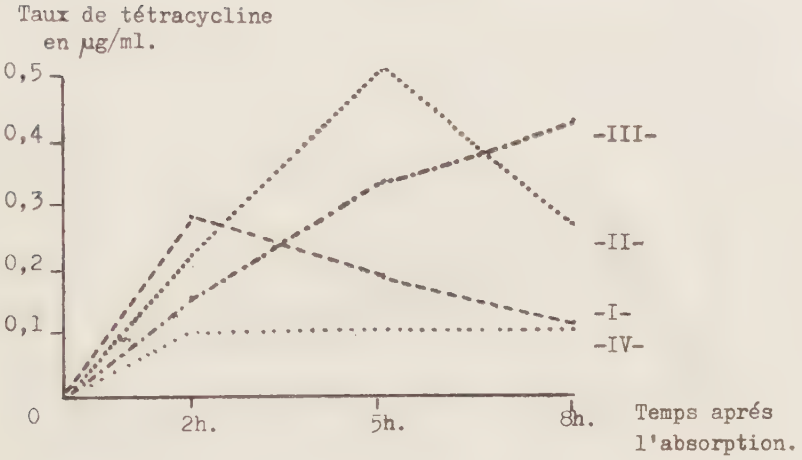
DANS LA SALIVE



Taux moyens d'élimination de la tétracycline dans la salive déterminés chez 40 sujets adultes sains après administration par voie orale d'une dose unique correspondant à 2 grammes de tétracycline base.

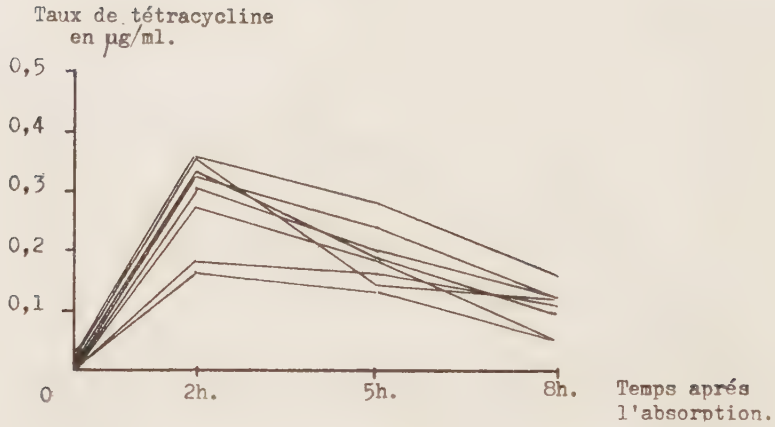
DIFFERENTS TYPES DE COURBES D'ELIMINATION

DE LA TETRACYCLINE DANS LA SALIVE



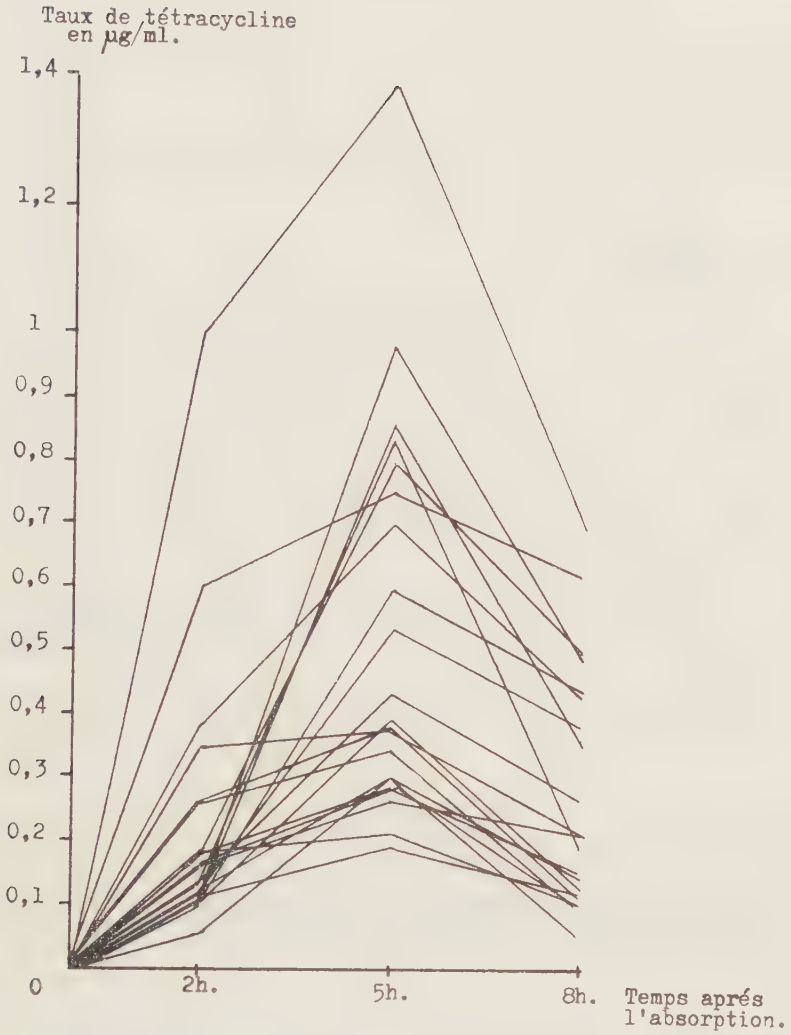
Taux moyens de tétracycline dans la salive pour chaque groupe de courbes d'élimination, selon que le maximum de l'élimination se fait à la 2e, la 5e, la 8e heure après l'absorption d'une dose unique de 2 grammes de tétracycline base, chez l'adulte sain.

GROUPE I .



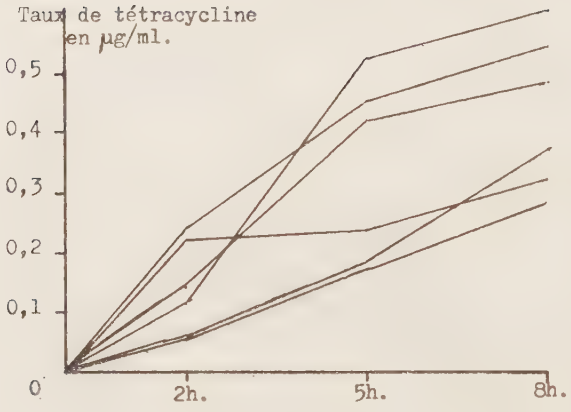
Courbes d'élimination salivaire de la tétracycline dont le sommet se trouve à la 2e heure après l'absorption d'une dose unique de 2 g de tétracycline base chez l'adulte sain.

GROUPE II .



Courbes d'élimination salivaire de la tétracycline dont le sommet se trouve à la 5e heure après l'absorption d'une dose unique de 2 g de tétracycline base chez l'adulte sain.

GROUPE III .



Courbes d'élimination salivaire de la tétracycline dont le sommet se trouve à la 8e heure après l'absorption d'une dose unique de 2 g de tétracycline base chez l'adulte sain.

DISCUSSION

I. — Analyse des travaux antérieurs

Au cours d'une revue générale des travaux effectués sur la circulation et le devenir des antibiotiques dans l'organisme humain, nous avons relevé certaines études qui concernent plus particulièrement l'élimination des tétracyclines dans la salive. Les résultats publiés sont analogues à ceux que nous avons obtenus.

Après une dose intraveineuse de 100 mg d'auréomycine, Z. Antalovska et Coll. (2) ont retrouvé l'antibiotique dans la salive de trois sujets sur dix seulement.

Bender I.B. (6) et Borzelleca J.F. (11) ont enregistré, après une dose orale de trois grammes d'oxytétracycline ou de chlortétracycline, un taux maximum d'antibiotique dans la salive de 0,42 μg/ml, 2 heures 30 après l'absorption.

Le taux maximum d'antibiotique trouvé dans la salive par De Maynard et Coll. (43) après administration par voie orale d'une dose quotidienne de 1 gramme de chlorhydrate de tétracycline pendant dix jours est de 0,84 μg/ml.

G. Curci et Coll. (22) ont obtenu après une injection de 250 mg de tétracycline L. méthylène lysine par voie intramusculaire des taux décroissant de 0,66 μg/ml à la 1re heure à 0,29 μg/ml à la 24e heure.

A la dose unique de 600 mg de déméthylchlortétracycline, Pellerat J. et Mme Maillard (60, 61) ont obtenue des taux de 0,20 à 0,80 μg/ml à la 6e heure avec baisse progressive par la suite et disparition après la 12e heure. Même avec des doses répétées les taux sont restés très bas, très inférieurs aux taux sériques.

II. — Commentaires sur nos résultats personnels

Tous les volontaires retenus pour notre expérimentation ayant été rigoureusement soumis au même protocole expérimental, et la fidélité de la méthode de dosage ne pouvant être mise en cause, ces variations individuelles de l'élimination de la tétracycline dans la salive ne peuvent dépendre que de deux facteurs :

— l'absorption du médicament par la muqueuse digestive (la prise du médicament se fait par voie orale) ;

— la diffusion et l'excrétion au niveau des glandes salivaires.

L'absorption digestive du « Tétramig » a été étudiée par J. Monnier.

Après administration par voie orale de 0,50 g de tétracycline chez les adultes sains, les taux moyens de l'antibiotique dans le sang sont ainsi de :

— 3,43 μg/ml $\pm$ 0,38 à la 2^{e} heure après l'absorption,

— 2,41 μg/ml $\pm$ 0,30 à la 4^{e} heure après l'absorption,

— 1,02 μg/ml $\pm$ 0,25 à la 8^{e} heure après l'absorption.

Ces résultats indiquent une bonne et rapide absorption de la tétracycline, le taux sanguin maximum étant atteint à la 2^{e} heure.

Ces résultats montrent d'autre part une constance relative des concentrations sériques enregistrées à un temps donné, d'un sujet à l'autre.

Elimination salivaire de la tétracycline

Il découle des conclusions précédentes que l'élimination de la tétracycline dans la salive est essentiellement conditionnée par le fonctionnement des glandes salivaires. Il n'y a pas de corrélation entre la pharmacocinétique sérique et la pharmacocinétique salivaire de cet antibiotique : le maximum de l'élimination dans la salive survient tardivement après le maximum de l'absorption, le taux salivaire est toujours très bas comparé au taux sérique, l'antibiotique disparaît plus vite dans la salive que dans le sang.

Il ne s'agit donc pas d'une sécrétion de tétracycline donnant un taux salivaire plus concentré que le taux sérique, mais plutôt d'une excrétion passive : il est probable que les glandes salivaires fonctionnent comme une membrane laissant filtrer la tétracycline, la perméabilité de cette membrane variant de façon importante d'un sujet à l'autre, en fonction de facteurs physiologiques ou pathologiques.

Borzelleca J. F. (11) compare le comportement des acini salivaires vis-à-vis de la tétracycline, au fonctionnement du tubule rénal où la phase de réabsorption ferait défaut.

D'après Bénazet F. et Dubost M. (5) et Wozniak L. A. (77), la diffusion de l'antibiotique hors du compartiment vasculaire dépend de son taux de liaison avec les protéines du sérum. Mais la distribution n'est pas égale dans tous les tissus, et certains présentent une affinité particulièrement grande pour la tétracycline.

Avec l'étude de l'élimination salivaire de la tétracycline, on retombe sur le problème de la diffusion de la tétracycline dans les tissus, dont la solution permettrait aussi d'expliquer pourquoi les taux de tétracycline dans les tissus pathologiques (réaction inflammatoire et collection suppurée) sont bien supérieurs aux taux dans les tissus sains voisins, selon le rapport des travaux de Lock et Malek fait par Bénazet F. et Dubost M. (5).

Intérêt thérapeutique de la tétracycline dans la salive

Le milieu buccal est éminemment septique. On peut dire que tous les germes s'y trouvent, mais que du fait d'une symbiose locale de défense particulièrement active, leur présence ne s'accompagne pas de manifestations pathologiques. L'étude de la flore microbienne de la salive, des tissus cariés et des foyers apicaux, constate l'existence de très nombreux germes cités selon leur fréquence :

Entérocoques :	94 %	Proteus vulgaris :	60 %
Streptocoques :	92 %	B. fusiformes :	60 %
Staphylocoques :	80 %	B. acidophiles :	52 %
Spirilles :	72 %	Pneumocoques :	18 %
Catarrhalis :	68 %	Colibacilles :	26 %

Le large spectre d'action bactériostatique de la tétracycline s'étend sur tous ces germes, exception faite des souches présentant une résistance acquise.

A la lumière des résultats de notre expérimentation il apparaît que la salive renferme de la tétracycline active en faible quantité, les taux salivaires moyens ne dépassant les concentrations minimales inhibitrices que pour certains germes tels les pneumocoques, les streptocoques du groupe A, les staphylocoques. Des taux thérapeutiques peuvent être obtenus à condition d'utiliser de fortes doses de tétracycline.

Au cours d'un traitement habituel par la tétracycline, de brillants résultats thérapeutiques seront obtenus sur les processus infectieux de la cavité buccale grâce à la qualité de diffusion de l'antibiotique dans les tissus pathologiques.

Conclusions

Après avoir brièvement souligné l'intérêt en clinique du dosage des antibiotiques dans les humeurs et les tissus de l'organisme pour le choix d'une antibiothérapie, nous avons décrit l'étude de l'élimination salivaire de la tétracycline.

Nous avons retenu la technique de diffusion horizontale sur gélose en boîte de Pétri qui nous a paru la mieux adaptée à la qualité de l'échantillon à doser, la plus sensible, la plus fidèle dans sa répétition, la plus pratique et la plus agréable dans sa réalisation.

Malgré un protocole expérimental rigoureux, nous avons observé une importante variation individuelle des taux de tétracycline contenue dans la salive, variation attribuée pour une grande part au fonctionnement des glandes salivaires. Une courbe d'élimination de la tétracycline dans la salive a pu être dessinée, montrant chez l'adulte sain, après absorption d'une dose unique de 2 grammes de tétracycline à jeun, un maximum d'élimination à la cinquième heure après l'absorption, une disparition lente de la huitième à la vingt-quatrième heure.

Les résultats de notre expérimentation laissent prévoir un intérêt thérapeutique local de la tétracycline dans la salive qu'après l'administration de fortes doses d'antibiotique, l'effet thérapeutique étant au cours d'un traitement habituel obtenu grâce à la bonne diffusion de la tétracycline dans les tissus pathologiques.

Vu : *le Président du Jury,*

J. MONNIER.

Vu et permis d'imprimer :

Toulouse, le 25 mars 1971,

Le Président de l'Université Paul-Sabatier,

L. LARENG.

Bibliographie

1 — ANDERSON R.L., FERGUSON A.B., BRAUDE A.I. — Tetracycline . concentration in tissues ; Determination by diffusion method. *Antibiotics and chemotherapy*, 1959, *9*, 109.

2 — ANTALOVSKA Z., LONSKA G. — Penetration of tetracycline antibiotics into the saliva under physiological conditions. *Casopis Lekaru Ceskyck*, 1963, *102*, 390.

3 — AZECKI H., YONEZAWA S., NAKAMURA H. — Studies on the distribution of antibiotics in body. *The Journal of Antibiotics*, 1967, *20*, 19.

4 — BARME M., CHABBERT Y. — Concentrations humorales de tétracycline per os. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, *88*, 255.

5 — BENAZET F., DUBOST M., JOLLES G. — Liaisons et modifications des antibiotiques *in vivo*. *Biologie médicale*, 1965, *5*, 376.

6 — BENDER I.B., PRESSMAN R.S., TASHMAN S.G. — Excretion of antibiotics in human saliva. *J. Amer. Dental Asso.* 1953, *32*, 164 ; 1953, *32*, 287 ; 1953, *46*, 435.

7 — BLINOV N.O., KHOKLOV A.S. — Chromatographie et électrophorèse sur papier pour l'étude du métabolisme des antibiotiques dans l'organisme humain. *Antibiotiki S.S.S.R.*, 1967, *12*, 3, 261.

8 — BOHONOS N., DORNBUSH A.C., FEDMAN, PELACK. — *In vitro* studies with chlortetracycline, oxytetracycline, and tetracycline. *Antib. Annual*, N.Y. M. Encycl., 1954, 49.

9 — BOOTHE J.M. — Tetracycline. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, 75, 4621.

10 — BOOTHE J.M., MORTON I.I. — Chemistry of tetracycline. *Antib. Annual*, N.Y. M. Encycl., 1953, 32.

11 — BORZELLECA J.F., CHERRICK H.M. — Excretion of drug in saliva. Antibiotics. *J. Oral Therap. Pharm.*, 1968, *3*, 2, 180.

12 — BOUSQUET M. — Répartition des antibiotiques dans les tissus. *Vie médicale*, 1969, *91*, 4442.

13 — BURGEN A.S.V., EMMELIN N.G. — *Physiology of the salivary glands*, Londres, 1961.

14 — CAFFAU S., JACOBACCI S. — Biotransformations of tetracycline antibiotics. *Minerva Med.*, 1962, *53*, 3757.

15 — DE CARNERI I., MEINARDI G. — The microbiological assay of antibiotic preparations. *Farmaco. Ed. Prat.*, 1968, *8*, 23, 468.

16 — CHABBERT Y., BOULINGRE H. — Modifications pratiques concernant le dosage des antibiotiques. *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 1957, *2*, 636.

17 — CHABBERT Y., MARTIN R., SUREAU B. — Choix d'un antibiotique. *Le concours médical*, 1968, *21*, 4513.

18 — CODEX FRANÇAIS, Paris.

19 — CONOVER L.H. — Tetracycline. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, *75*, 4622.

20 — CRAIPEAU, VELU. — Méthode simple de titrage de la pénicillinémie par diffusion. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 11, *144*, 780.

21 — CUNNINGHAM R.W., HINES L.R. — Tetracycline pharmacology. *Antib. Annual*, N.Y. M. Encycl., 1953, 53.

22 — CURCI G., PIZZONI D. — Experimental research on the salivary elimination of tetracycline L methylene lysine in man. *Minerva Stomatol.*, 1966, 15, *12*, 791.

23 — DECHAUME M. — *Précis de Stomatologie.* Paris, Masson, 1946, 4e éd.

24 — DOWLING H.F. — Tetracycline. *Antibiotics monograph. n° 3*, N.Y. M. Encycl., 1965.

25 — DUMAS J. — *Bactériologie médicale.* Paris, Flammarion, 1965.

26 — ENGLISH A.R., P'AN S.V. — Tetracycline. Microbiology, pharmacology, clinical evaluation. *Antibiotics and chemotherapy*, 1954, 4, 411.

27 — FINLAND M., PURCELL E., WRIGHT S. — Clinical and laboratory observations of a new tetracycline antibiotic. *J.A.M.A.*, 1954, *154*, 561.

28 — FRIEZ, MUNIER, LAUDENBACH. — Antibiotiques fongiques en stomatologie. *Semaine des Hôpitaux*, 1955, *28*, 1622.

29 — GARRETT E.R. — Variations of pKa' values of tetracyclines in dimethylformamide water solvents. *J. Pharmac. Sci.*, 1963, 8, *52*, 797.

30 — Document GEIGY. — Salive, p. 533.

31 — GROVE D.C., RANDALL W.A. — Assay methods of antibiotics. New York, *Medical Encyclopedia*, 1955.

32 — HAYES J.E., DU BUY H.G. — A simple method for quantitative determination of tetracycline antibiotics. *Anal. Biochem.*, 1964, 3, *7*, 322.

33 — HIRSCH H.A., FINLAND M. — Comparative activity of four tetracycline against pathogenic bacteria *in vitro*. *Amer. J. Med. Sci.*, 1960, *239*, 62.

34 — HOPPE-SEYLER, THIERFELDER. — *Handbush der physiologisch und pathologisch, chemischen analyse.* Berlin, Lang, 10e éd., 1953, 5, 357.

35 — HRADECKY A., KELENTEY B. — Salivary excretion and inactivation of some penicillins. *Nature*, 1963, *198*, 792.

36 — IBSEN K.H., SAUNDERS R.L., URIST M.R. — Fluorimetric determination of oxytetracycline in biological material. *Anal. Biochem.*, 1963, 5, 505.

37 — KELLY R.G., FLOY H.A., HOYT DK. — Identification problems in metabolism of tetracycline. *Antimicrob. agents Chemotherap.*, 1967, 666.

38 — KELLY R., ROBERTS G., PEETS. — Fluorimetric method of analysis for tetracycline. *Anal. Biochem.*, 1969, *28*, 222.

39 — KIRBY W.M., ROBERTS G.E., BURDICK R.E. — Comparative study of two new tetracyclines with tetracycline. *Antimicrobiol. agents Chemotherap.*, 1962, 286.

40 — KIRSHBAUM A. — Outline details for assaying commonly used antibiotics. *Antibiotics and chemotherapy*, 1959, 9, 613.

41 — KISER I.S., DE MELLO G.C. — A comparative evaluation of the tetracycline antibiotics in experimental infections. *Antib. Annual, N.Y. M. Encycl.*, 1953, 56.

42 — KUNIN C.M., DORNBUSH A.C., FINLAND M. — Distribution and excretion of four tetracyclines analogues in normal young man. *J. Clin. Invest.*, 1959, *38*, 1950.

43 — LAWSON D. — Penetrability of mucus by antibiotics. *Bibl. Pediatr. Suisse*, 1967, *86*, 332.

44 — LOCK F.L., LASKIN D.L., ENGEL H.B. — Tetracycline penetration in pathological tissues. *J. Pharmacol. Therap.*, 1963, *141*, 131.

45 — MANN C.H., BUNN P., REIN C.R. — Tetracycline determination of serum concentration. *Antib. Annual*, N.Y. M. Encycl., 1954, 637.

46 — MARIANI M. — Il liquido buccale. *Rivista Ital. Stomatol.*, 1954, 9, 1621.

47 — DE MAYNARD, ANDRIOLA, PRIGOT. — Etudes sur l'absorption, la diffusion, l'excrétion du chlorhydrate de tétracycline et expérimentations cliniques. *Antib. Annual*, N.Y. M. Encycl., 1953, 102.

48 — MEYER K. — Lysozyme. *Bull. N. York Acad.*, 1954, *30*, 995.

49 — MINIERI P.P., FIRMAN M.C., MISTRETTA. — A new broad-spectrum antibiotic product of the tetracycline group. *Antib. Annual*, N.Y. M. Encycl., 1953, 81.

50 — MITCHINSON, SPICER. — A method of estimating streptomycin in serum and other body fluids. *J. of Gen. Microb.*, 1949, *3*, 184.

51 — MONNIER J., BOURSE R., ONFREY J. — Tétracycline, déméthhylchlortétracycline, méthacycline. *Antibiotica*, 1965, *3*, 31.

52 — MONNIER J., BOURSE R., ONFREY J. — Doxycycline, activité bactériostatique *in vitro* et taux sériques chez l'homme. *Antibiotica*, 1966, *4*, 268.

53 — MUGNIER, MARIE, GARLOPEAU. — Traitement anti-infectieux en stomatologie. *Encycl. Méd. Chir.*, L 10, 22037.

54 — N... — 67e et 68e notes techniques, Pro Pharmacopea. *Ann. Pharm. Franç.*, 1960, *18*, 590.

55 — NARANJO P., DE MORENO J.C. — Combined effect of lysozyme and various antibiotic agents. *Rev. Ecuator Med. Cienc. Biol.*, 1963, 3, *1*, 134.

56 — NEUMAN M. — *Vademecum des antibiotiques*. Paris, Maloine Doin, 1962, 201 et 355.

57 — NEUMAN M. — Principes de base et critères de choix de la prescription des antibiotiques. *Ars Medici*, 1967, *5*, 576.

58 — NEUMAN M. — Pharmacologie clinique des antibiotiques. *Vie Médicale*, 1969, *41*, 5329.

59 — OSTER & Coll. — Salive. *J. Appl. Physiol.*, 1953, *6*, 348.

60 — PELLERAT J. — Sur l'élimination salivaire de quelques antibiotiques. *Presse Médicale*, 1963, 45, *71*, 2135.

61 — PELLERAT J., MAILLARD M.A. — Etudes sur l'élimination salivaire de la spiramycine et de divers antibiotiques. *Actualités odonto-stomatologiques*, 1963, *61*, 1.

62 — PITET G., LUU SI NANG, PERRET G. — Extraction et dosage des tétracyclines. Méthodes physico-chimiques rapides. *Prod. et Probl. pharmaceutiques*, 1964, 12, *19*, 565.

63 — PITTON J.S. — Microbiological determination of antibiotics. Development and justification of the method. *Pharm. Acta Helvet.*, 1966, 11, *41*, 622.

64 — PURCELL E.M., WRIGHT S., MOU T.W., FINLAND M. — Blood level and urinary secretion after tetracycline oral doses. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1954, *85*, 61.

65 — PUTNAM J., HENDRICKS F.D., WELCH H. — A new antibiotic : tetracycline. *Antib. Annual, N.Y.* M. Encycl., 1953, 88.

66 — REMINGTON J.S., FINLAND M. — Antibacterial activity of serum after oral doses of tetracycline. *Clin. Pharmac. Therap.*, 1961, 3, *3*, 284.

67 — ROBERTS C.E., PERRY D.M., KUHARIC, KIRBY. — Demethylchlortetracycline and tetracycline. *In vitro* activity. Blood level. Serum effect. *Arch. Int. Med.*, 1961, *107*, 204.

68 — RUDINU I. — Il lisozima nella saliva. *Rass. Med. Sarda*, 1954, 56, 67.

69 — SASSINOT L., CHABBERT Y. — Concentrations tissulaires de tétracycline. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, 2, *98*, 267.

70 — SCHUMACHER G.E. — Atetracycline tableau chemistry, pharmacology, and pharmacy. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 1963, 20, 580.

71 — SIL'VESTROV V.P., MALOV Y.S. FEOLILOVA V.G. — Fluorimetric determination of tetracycline in biological fluids. *Lab. Delo*, 1963, *9*, 5.

72 — STEMPEL E. — Strides in the development of the tetracyclines. *Am. J. Pharm.*, 1962, *134*, 114.

73 — TARRAL R., CARRAZ M., YAVORDIOS D. — Contribution à l'étude du dosage microbiologique de la tétracycline. *Ann. Pharm. Franç.*, 1962, 11, *20*, 53.

74 — VERVEY W.F., WILLIAMS H.R., KALSOW C. — Circuclation of antibiotics in blood. *Antimicrob. agents and chemotherapy*, 1965, 1016.

75 — WINTERMERE D.M. — Turbidic assay of tetracycline, chloramphenicol, neomycine. *Antibiotics and chemotherapy*, 1957, *7*, 184.

76 — WOERHLE J.C. — *Répartition des antibiotiques dans les tissus*. Thèse Méd., Lyon, 1968.

77 — WOZNIAK L.A. — Studies on binding of tetracycline by human plasma. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1960, *105*, 430.

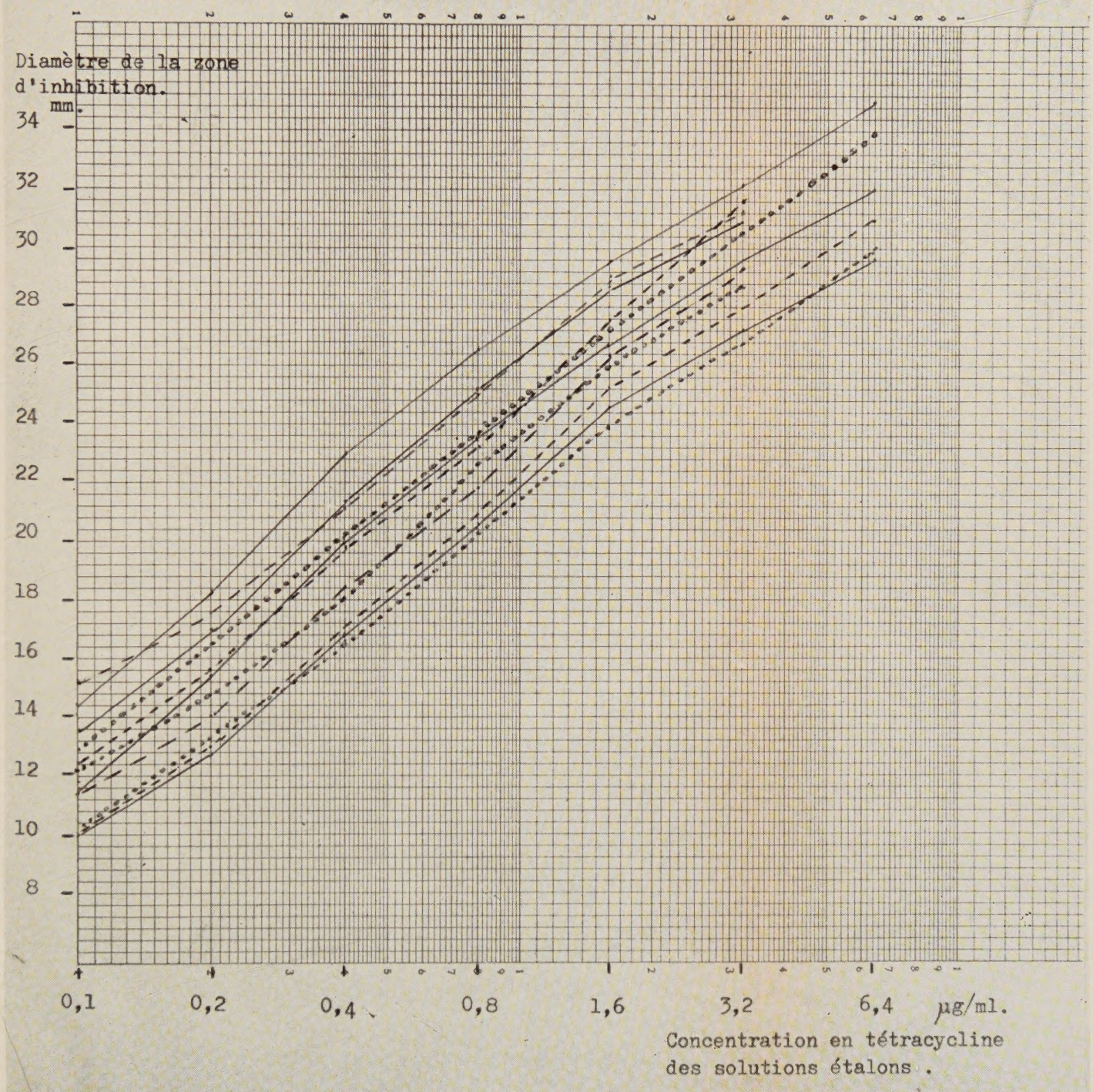
78 — WRIGHT S., PURCELL E.M., FINLAND M. — Clinical and laboratory observations on tetracycline. *Antib. Annual*, N.Y. M. Encycl., 1953, 92.

79 — YAVORDIOS D., CARRAZ M., MANCHET M. — Standardisation des dosages microbiologiques. Dosage de la tétracycline. *Ann. Pharm. Franç.*, 1967, 7, 25, 543.

80 — YUKORFSKY A. — *Le lysozyme et l'activité antibactérienne de la salive*. Thèse Méd., Genève, 1957.

81 — ZAK A.F. — Etude de l'activité biologique de la tétracycline en utilisant des cultures tissulaires. *Antibiotiki S.S.S.R.*, 1966, 8, *11*, 698.

82 — ZAOLI G. — Attivita lisozimica della saliva in corso di terapia con aureomicina, teramicina, cloramfenicol. *Otorinolar. Ital.*, 1954, *22*, 175.

83 — ZELDOW B.J. — Antibacterial action of human saliva. *J. Dentol. Research*, 1959, *38*, 798.

COURBES D'ETALONNAGE POUR LE DOSAGE DE LA TETRACYCLINE .